MINISTERE DE LA JEUNESSE, DE L'EDUCATION NATIONALE
ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par
Nadège GOUY

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

ANALYSE DES REMANIEMENTS DU GENE *C-MYC* DANS LES LYMPHOPATHIES B PAR HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE SUR FIBRES D'ADN

Soutenu le 15 Octobre 2004, devant le jury suivant :

Pr Bernard MIGNOTTE	Président
Pr Stéphane RICHARD	Rapporteur
Mr Bruno CANQUE	Examinateur
Pr Hervé AVET-LOISEAU	Examinateur

Laboratoire de Génétique Oncologique EPHE — Directeur: Pr Stéphane RICHARD
Faculté de Médecine Paris Sud — e-mail : stephane.richard@kb.u-psud.fr
63,rue Gabriel Péri

Laboratoire de cytogénétique hématologie — Directeur : Pr Hervé AVET-LOISEAU
8, quai Moncousu C.H.U de Nantes — e-mail : havetloiseau@chu-nantes.fr
44093 NANTES Cedex

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

ANALYSE DES REMANIEMENTS DU GENE *C-MYC* DANS LES LYMPHOPATHIES B PAR HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE SUR FIBRES D'ADN

Nadège GOUY

RESUME

Le myélome multiple et le lymphome folliculaire sont deux lymphopathies B malignes qui se ractérisent par une accumulation monoclonale de cellules B.

Pour le myélome multiple, la prolifération anormale de plasmocytes au niveau de la moelle osseuse ıccompagne en général d'un pic d'immunoglobuline monoclonale et de lésions osseuses. Les analyses togénétiques montrent de multiples anomalies chromosomiques de nombre ou de structure. Le gène codant ur les chaînes lourdes des immunoglobulines en 14q32 est réarrangé dans la plupart des lignées et dans 60 75% des patients. De nombreux partenaires du chromosome 14q32 ont été identifiés. Les plus courants sont région 11q13 codant pour la cycline D1, la région 4p16 impliquant le gène *FGFR3* et la région 16q24 ntenant le gène *C-MAF*. Les réarrangements avec ces trois partenaires sont précoces dans l'oncogenèse du yélome multiple. Par contre, l'oncogène *C-MYC* positionné en 8q24 est dérégulé par les enhancers de la gion constante des immunoglobulines lors d'un stade plus tardif de l'oncogenèse du myélome multiple. La rexpression de la protéine c-myc participe à l'immortalisation des cellules. La technique d'hybridation in u en fluorescence sur fibres d'ADN ou Fiber-FISH permet de visualiser les remaniements chromosomiques de localiser les points de cassure au niveau des deux chromosomes partenaires avec une grande précision. majorité des réarrangements comme les translocations, les insertions, les délétions et les inversions plique une région switch située en amont de la plupart des gènes de la région constante des munoglobulines. Dans les lignées de MM possédant une insertion ou une translocation t(8;14), les zones vitch mais également des régions éloignées des switch participent à ces remaniements. Dans les lignées et ez les patients, on constate une grande hétérogénéité au niveau de la localisation des points de cassure de rt et d'autre des exons de *C-MYC* dans la région 8q24.

Le lymphome folliculaire est caractérisé par une prolifération monoclonale des cellules B des ntres germinatifs des follicules lymphoïdes. Le réarrangement moléculaire le plus récurrent est la nslocation t(14;18) mais d'autres réarrangements comme la translocation t(8;9) sont également observés ns les deux KARPAS 231 et 353 ainsi que chez un patient. Dans ces trois cas de figure, les points de ssure se localisent proches des gènes *C-MYC* et *PAX5*, impliquant potentiellement ces deux gènes dans ncogenèse du lymphome folliculaire.

MOTS CLES: Myélome Multiple, Lymphome Folliculaire, Fiber-FISH Immunoglobuline, Switch, C-MYC, PAX5.

Abréviations..... 1

Introduction..... 2

GENERALITES

1. LE MYELOME MULTIPLE..... 3

1.1. Définition..... 3

1.2. Epidémiologie..... 3

1.3. Etiologie..... 4

1.4. Oncogenèse..... 4

1.5. Diagnostic clinique, biologique et cytogénétique..... 7

1.5.1. Manifestations cliniques..... 7

1.5.2. Manifestations biologiques..... 7
1.5.3. Réarrangements cytogénétiques..... 8
1.6. Traitements..... 9
1.6.1. Facteurs pronostiques..... 9
1.6.2. Classification de Durie et Salmon..... 10
1.6.3. Chimiothérapie..... 11
1.6.2. Autres médicaments..... 11
2. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE..... 12
2.1. Définition..... 12
2.2. Epidémiologie..... 12
2.3 Oncogenèse..... 13
2.4. Diagnostic clinique, biologique et cytogénétique..... 13
2.5. Traitements..... 14
2.5.1. Facteurs pronostiques..... 14
2.5.2. Traitements..... 14
3. LE GENE DES IMMUNOGLOBULINES..... 16
3.1. Structure des immunoglobulines..... 16
3.2. Le gène codant les immunoglobulines..... 17
3.3 Différenciation indépendante de l'antigène..... 18
3.4. Différenciation dépendante de l'antigène..... 20
4. RAPPELS SUR LES TRANSLOCATIONS DANS LE MM..... 22
5. LES GENES *C-MYC* et *PAX5*..... 24
5.1. Généralités sur le gène *C-MYC*..... 24
5.2. Généralités sur le gène *PAX5*..... 25
5.3 Remaniements moléculaires de *C-MYC* et *PAX5*..... 25
5.3.1. Le Myélome Multiple..... 25
2.5.2. Le Lymphome folliculaire..... 27

MATERIEL ET METHODES

1. CRITERE DE CHOIX DE LA METHODE DE FIBER-FISH..... 28
2. LES LIGNEES CELLULAIRES DES LYMPHOPATHIES B..... 30
2.1. Caractéritiques des lignées de Myélome Multiple..... 30
2.2. Caractéritiques des lignées de Lymphome Folliculaire..... 32
3. LES PATIENTS ETUDIES..... 33

3.1. Caractéritiques des patients étudiés atteints de Myélome Multiple..... 34

3.2. Caractéritiques du patient étudié atteint de Lymphome Folliculaire..... 35

4. PREPARATION DES SONDES..... 35

4.1. Caractéritiques des sondes..... 35

4.2. Culture cellulaire des clones..... 37

4.3. Extraction des sondes..... 38

4.4. Marquage des sondes..... 38

5. LA TECHNIQUE DE FIBER-FISH..... 39

5.1. Préparation des blocs d'agarose contenant l'ADN..... 39

5.2. Préparation des lames..... 39

5.3 Hybridation in situ..... 40

5.3.1. Précipitation et dénaturation des sondes..... 40

5.3.2. Dénaturation des fibres d'ADN fixées sur la lame..... 40

5.3.3. Etape d'hybridation..... 41

5.3.4. Lavages des lames..... 41

5.3.5. Révélation par les anticorps..... 41

5.3.6. Lecture par imagerie..... 42

5.3.7. Récapitulatif du mode d'emploi..... 43

6. LES AUTRES METHODES D'HYBRIDATION..... 44

6.1. Technique de FISH classique sur noyaux interphasiques ou sur métaphases..... 44

6.2. Technique de peinture de chromosomes..... 44

RESULTATS ET INTERPRETATION

1. ETABLISSEMENT DES CODES BARRES..... 45

2. ETUDES DES LIGNEES CELLULAIRES DE MM..... 49

2.1. Les lignées cellulaires de MM avec une insertion..... 49

2.1.1. La lignée JJN3..... 50

2.1.2. La lignée OPM2..... 52

2.1.3. La lignée KMS-12..... 54

2.2. Les lignées cellulaires de MM avec une translocation..... 56

2.2.1. La lignée AMO-1..... 56

2.2.2. La lignée SKMM-1..... 59

2.2.3. La lignée KARPAS 620..... 62

2.2.4. La lignée KMS-11..... 65

2.2.5. La lignée LP1..... 67

3. ETUDES DES PATIENTS ATTEINTS DE MM..... 71

4. ETUDES DES LIGNEES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE ET DU PATIENT..... 76

4.1. La lignée KARPAS 231..... 76

4.1.1. Technique de peinture de chromosomes..... 76

4.1.2. Technique de FISH classique..... 76

4.1.3. Technique de Fiber-FISH..... 78

4.2. La lignée KARPAS 353..... 79

4.2.1. Technique de peinture de chromosomes..... 79

4.2.2. Technique de FISH classique..... 79

4.2.3. Technique de Fiber-FISH..... 81

4.3. Patient atteint de lymphome folliculaire..... 82

4.3.1. Technique de peinture de chromosomes..... 82

4.3.2. Technique de FISH classique..... 82

DISCUSSION..... 84

CONCLUSION..... 92

ANNEXE..... 93

BIBLIOGRAPHIE..... 95

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
BAC: Bacterial Artificial Chromosome
CCND1 : Cycline D1
CH : partie constante du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines
DAPI : 4'-6 diamidino-2-phénylindole
EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique
FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH: Fluorescence In Situ Hybridization
FITC: Isothiocyanate de fluorescéine
Ig : Immunoglobuline
IGH : Chaîne lourde des immunoglobulines
IL-6 : Interleukine 6
kb : Kilobase(s)
LF: Lymphome folliculaire
Mb : Mégabase(s)
MM : Myélome Multiple
MTC: Major Translocation cluster
PAC: P1 Artificial Chromosome
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCL: Leucémie plasmocytaire
SB: Southern Blot
SSC: Sodium Saline Citrate

TE: Tris-EDTA
TN: Tris NaCl
TNB: Tris Nacl Blocking reagent
TNT : Tris NaCl Tween 20
VH : Partie variable du gène des immunoglobulines
YAC: Yeast Artificial Chromosome

INTRODUCTION

Les lymphopathies B malignes regroupent toutes les pathologies caractérisées par une accumulation de cellules pré B, B ou plasmocytaires, dont le myélome multiple et le lymphome folliculaire. Des anomalies chromosomiques provoquent des dysfonctionnements au niveau de gènes cellulaires normaux jouant des rôles importants dans la différenciation cellulaire.

Dans le myélome multiple, le gène qui code la partie constante des chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig) est très souvent réarrangé avec différents partenaires dont l'oncogène *C-MYC*. La majorité des réarrangements entre chromosomes implique les zones switch situées en amont de la plupart des gènes de la région constante des Ig. Deux types de switch ont été mis en évidence (Bergsagel et al., 1996; Ho, 2001) :

- ✓ Le « switch légitime » a lieu entre deux zones switch (Sm et Sg, Se ou Sa). Cette étape peut se dérouler sur le même chromosome ou, plus rarement entre deux switch sur deux chromosomes homologues.
- ✓ Le « switch illégitime » n'implique qu'une seule zone switch qui s'associe avec des régions autres lors de translocation, d'insertion, de délétion ou d'inversion.

Les procédés d'association du gène *C-MYC* à la région codant les Ig et les points de cassure sont multiples. Le gène *C-MYC* est ainsi dérégulé par sa juxtaposition avec à une région du locus des Ig.

Une particularité du lymphome folliculaire est la présence de remaniements cytogénétiques impliquant la région de *C-MYC* par le biais de la translocation t(8 ;9).

La technique de Fiber-FISH pourrait élucider certains évènements moléculaires associés à l'apparition des ces deux lymphopathies B chez l'homme.

GENERALITES

1. LE MYELOME MULTIPLE

1.1. Définition

Le myélome multiple ou maladie de Kahler est une prolifération intra-médullaire maligne de cellules plasmocytaires au niveau de la moelle osseuse, sous forme nodulaire et parfois diffuse.

Ce développement d'un clone de plasmocytes tumoraux est responsable d'une destruction osseuse, d'une inhibition de l'hématopoïèse normale et parfois d'une insuffisance médullaire.

Le MM s'accompagne d'une sécrétion d'immunoglobulines monoclonales, parfois responsable de manifestations rénales, neurologiques et d'amylose.

1.2. Epidémiologie

L'incidence du MM dans les pays occidentaux est de 3 à 4 pour 100 000 habitants par an. Le nombre de cas nouveaux par an est en augmentation constante (Grosbois et al., 2002) et représente entre 2000 et 2500 malades par an, en France.

Le MM représente 1% des tumeurs malignes et 10% des hémopathies. Cette pathologie est deux fois plus commune chez les Afro-américains que chez les Caucasiens (Brunning et al., 1994). Une sensible prédisposition masculine montre que 1,1 à 1,5 hommes sont affectés pour une femme.

L'incidence augmente avec l'âge, avec une médiane à 70 ans au moment du diagnostic. Le MM est rarement diagnostiqué chez les individus de moins de 35 ans ; moins de 2% ont moins de 40 ans et 3% ont plus de 80%. La médiane de survie est de l'ordre de deux à trois ans avec traitement mais son évolution est très variable selon les cas (Pratt, 2002). Le MM est aujourd'hui encore incurable. En France, le MM est responsable de 1% des décès par cancer et provoque la mort d'environ 2000 personnes par an (Facon, 1997).

1.3. Etiologie

L'étiologie du MM est encore aujourd'hui inconnue et aucun facteur de prédisposition n'a été découvert.

Il a été observé deux sortes de MM chez l'homme. Chez environ un patient sur trois, on diagnostique d'abord une gammapathie monoclonale d'origine indéterminée ou MGUS caractérisée par une Ig monoclonale sans autres signes cliniques du MM, principalement les lésions osseuses. Dans les autres cas, les patients présentent un MM de novo sans apparition d'une MGUS au préalable (Avet-Loiseau et al., 2002).

Certains facteurs de risque ont été avancés comme l'exposition à des hydrocarbures et à des produits radioactifs. Des facteurs génétiques favorisants semblent également exister comme le montrent les rares formes familiales ou une plus grande incidence dans la population noire, toutefois ce facteur génétique n'est pas identifié.

1.4. Oncogenèse

L'oncogenèse du myélome multiple est complexe et n'est pas complètement connue.

Les plasmocytes prolifèrent lentement dans la moelle osseuse, ils sont dépendants de facteurs de croissance dont l'interleukine 6 (IL-6), fournis par le micro-environnement tumoral. Le myélome est

une maladie à cinétique de croissance tumorale lente, avec un temps de doublement long à la phase initiale.

Selon Bergsagel et son équipe en 2001, on peut considérer trois étapes dans l'évolution du MM.

- La phase initiale

Le premier événement est le dysfonctionnement de certains oncogènes par leur juxtaposition avec l'enhancer du gène *IGH* (plus rarement avec *IGL*). Ces translocations semblent se produire lors des réarrangements VDJ, lors des hypermutations somatiques ou lors de la commutation isotypique. Des erreurs lors de remaniements d'ADN peuvent entraîner des translocations chromosomiques, des délétions, des insertions ou des mutations ponctuelles (Kuipers et al., 1999). Ces translocations sont donc très précoces au cours de l'oncogenèse, elles interviendraient donc dans l'immortalisation d'une cellule plasmocytaire mais ne seraient pas suffisantes pour la rendre maligne.

De plus, ces translocations primaires sont présentes dans les MGUS alors que les translocations secondaires sont rares ou absentes du MGUS. Ces translocations primaires simples et réciproques comptent principalement trois partenaires pour le gène des *IgH* : le gène *CCND1* qui code la cycline D1 (11q13), les gènes *FGFR3* et *MMSET* (4p16) et le gène *C-MAF* (16q23).

- La phase secondaire chronique dite active

Tous ces remaniements génétiques provoquent une instabilité chromosomique. D'autres mutations sont alors observées, comme le dérèglement des oncogènes ras (*N-RAS* et *K-RAS*) (Bezieau et al., 2001). Ces mutations sont rencontrées dans 40% des cas et provoquent l'indépendance des cellules à IL6 et le blocage des phénomènes d'apoptose.

- La phase fulminante ou accélérée

Jusqu'à cette phase, les plasmocytes restent intra-médullaires ; un envahissement extra-médullaire caractérise la progression de la maladie. Le gène suppresseur de tumeur p53 est muté dans 5 à 10% des cas et empêche l'apoptose des plasmocytes (Avet-Loiseau, données personnelles, Bataille et al., 1997 ; Hallek et al., 1998). Des translocations secondaires plus complexes et parfois indépendantes du gène *IGH* sont détectées, comme la dérégulation du gène *C-MYC* positionné en 8q24 qui serait impliqué dans l'immortalisation du clone tumoral. Les anomalies chromosomiques sont plus

complexes, les insertions sont souvent non-totales et trois chromosomes différents peuvent intervenir.

Il semblerait que ces translocations secondaires ne soient pas les conséquences d'erreurs lors des remaniements d'ADN de la différenciation des cellules B (Bergsagel, 2000).

Plus récemment, un autre modèle d'oncogenèse des plasmocytes a été proposé par l'équipe de Avet-Loiseau en 2002. Ce modèle repose sur la corrélation entre les anomalies génétiques (14q32 et délétion du 13), le type d'Ig et les sous-types des chaînes légères et le diagnostic clinique.

Les translocations 14q32 représentent l'événement le plus précoce de l'oncogenèse du MM, principalement avec les partenaires 4p16, 11q13 et 16q23. Ces translocations utilisent le plus souvent les zones switch lors de la commutation isotypique et favorisent une instabilité chromosomique. La délétion du chromosome 13 serait le deuxième événement qui succèderait préférentiellement aux t(4 ;14) et t(14 ;16).

Dans cette étude, 25% des patients ne présentent aucun réarrangement du 14q32. Les translocations t(4 ;14), t(14 ;16) et certaines t(11 ;14) provoquent un MM de novo chez les patients. Au contraire, les patients n'exprimant pas de réarrangement du 14q32 ou un réarrangement avec des partenaires plus rares, développent un stade intermédiaire de MGUS avant l'apparition d'un MM.

1.5. Diagnostic clinique, biologique et cytogénétique

1.5.1. Manifestations cliniques

Le diagnostic du MM se fait le plus souvent chez un patient symptomatique. L'infiltration tumorale peut intéresser la rate, le foie, les ganglions, le plus souvent sans retentissement clinique. Dans les autres cas, les douleurs osseuses, une altération de l'état général ou la découverte d'anomalies biologiques sont les circonstances habituelles du diagnostic.

Les douleurs osseuses sont présentent au diagnostic dans 70% des cas et se localisent principalement au niveau du squelette axial : rachis, côtes et bassin. Les plasmocytes détruisent l'os par sécrétion de facteurs solubles qui activent les ostéoclastes péri-tumoraux.

Une insuffisance rénale est causée par la néphrotoxicité des chaînes légères.

Des complications neurologiques sont la conséquence de la compression médullaire.

Le syndrome d'hyperviscosité est le résultat de la concentration trop élévée et des propriétés biochimiques des immunoglobulines.

L'hypercalcémie est liée à l'importance de l'ostéolyse et ses principales manifestations cliniques sont digestives, neurologiques, cardio-vasculaires et métaboliques.

L'amylose due à l'infiltration des tissus (exemple : rein ou foie) par des substances amyloïdes

-

1.5.2. Manifestations biologiques

Un pic d'immunoglobuline monoclonale peut être détecté par électrophorèse et immunofixation des protéines sériques et urinaires, chez environ 80% des patients atteints de MM. Dans ce cas, le taux des autres classes d'Ig est abaissé. Environ 55% des MM sont IgG, 25% sont IgA, 15% sont des myélomes à chaînes légères et 5% restant sont constitués de variants rares.

La vitesse de sédimentation est souvent très augmentée et peut dépasser 100 mm à la première heure. Elle peut être normale dans les MM à chaîne légère et non sécrétant.

Une anémie est constatée chez 65% des patients.

Le taux de b2*-micoglobuline sérique* est fréquemment élevé (valeur normale chez l'adulte de 1,0 à 2,5 mg/L).

Une accumulation de plasmocytes est observée sur le myélogramme qui présente un envahissement de la moelle osseuse par des cellules plasmocytaires. Si le pourcentage de plasmocytes souvent anormaux est supérieur à 10%, ce critère est en faveur d'un MM. Mais cet argument doit s'ajouter à une immunoglobuline monoclonale ou à des lésions squelettiques.

1.5.3. Réarrangements cytogénétiques

L'analyse cytogénétique permet d'établir la présence d'anomalies récurrentes numériques et structurales.

On constate les gains, principalement des chromosomes impairs 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21 ; ainsi on obtient des clones hyperdiploïdes. Des pertes touchent préférentiellement le chromosome 13 ce qui entraîne une monosomie du 13 et plus rarement les chromosomes 8, 14 et X chez la femme.

On constate des anomalies structurales au niveau du chromosome 1, des réarrangements du chromosome 14q32, une délétion du chromosome 13q14 dans 43% des MM au diagnostic ou en rechute (Avet-Loiseau, 2002), des réarrangements du chromosome 14q32 avec des chromosomes partenaires 11q13, 4p16, 16q32, 8q24, etc …

Le réarrangement du 14q32 se déroule avec beaucoup de gènes partenaires différents (figures 4 et 5) : 1p13, 1p21, 3p11, 6p21, 6p25, 7q11, 7q32, 11q23, 12q24, 13q22, 16q24, 18q21, 21q22 et22q11 (Bergsagel, 1996) mais aussi, 9p13, 12p11, 12p13 et Xq28 (Avet-Loiseau, 1999).

1.6. Traitements

1.6.1. Facteurs pronostiques

Plusieurs facteurs sont considérés comme de mauvais pronostic pour le MM :

- Age élevé
- Le taux de b2-micoglobuline supérieur à 6mg/L est de très mauvais pronostic, il existe une corrélation linéaire entre ce taux et la survie (Anderson et al., 2002).
- Le taux de CRP
- Existence d'une amylose
- Le type d'Ig, le MM à IgA présente un mauvais pronostic
- Anomalies cytogénétiques : la délétion du chromosome 13 et la translocation t(4 ;14) seraient de mauvais pronostic. Par comparaison, la translocation t(11 ;14) serait de bon pronostic car les plasmocytes porteurs de la t(11 ;14) seraient moins proliférants que les plasmocytes non porteurs de la t(11 ;14). Les patients qui n'ont ni une t(4 ;14), ni t(11 ;14) auraient une survie intermédiaire, plus ou moins longue selon la présence de la délétion du chromosome 13 (Fonseca, 2002 ; Moreau, 2002; Fassas, 2002 ; Keats, 2003).

1.6.2. Le classification de Durie et Salmon

La classification de Durie et Salmon tente de corréler un certain nombre de paramètres cliniques courants à la masse tumorale. Cette classification ainsi que le dosage deb2-microglobuline et la délétion du chromosome 13 sont utilisés pour décider de la mise en place du traitement. Les patients des stades II et III sont systématiquement traités.

Il a été également établi une sous classification selon la fonction rénale :

- stade A : créatinémie < 175 µmol/l
- stade B : créatinémie > 175 µmol/l

Quel que soit le stade, l'existence d'une insuffisance rénale aggrave de manière importante le pronostic.

1.6.3. Chimiothérapie

La monochimiothérapie utilise l'association de Melphalan et de Prednisone et est prescrite chez les patients âgés de plus de 65 ans (Bergsagel, 2003). Le taux de réponse est de 40 à 60% mais avec

une durée moyenne de survie de 30 mois.

La polychimiothérapie couple différentes molécules VAD, VBAP, VMCP ou VBMCP (Harousseau, 2002). Ils permettent d'obtenir de meilleurs taux de réponse qu'avec la monochimiothérapie mais la médiane de survie reste de l'ordre de 3 ans.

L'interféron alpha améliore le taux de réponse et la durée de rémission (Grosbois, 2002) mais pas la survie du patient.

La chimiothérapie à forte dose suivie d'une ou deux autogreffe(s) de cellules souches périphériques est favorable chez les patients jeunes. Le taux de réponse complète est de 30 à 50% et la survie est améliorée. L'allogreffe de la moelle osseuse chez les personnes âgées de moins de 50 ans entraîne une forte mortalité initiale par rapport à l'autogreffe de cellules souches périphériques (Harousseau, 2002), mais permettrait peut-être l'obtention de guérisons.

1.6.4. Autres médicaments

Les bisphosphonates inhibent la résorption osseuse et permettent de diminuer les complications osseuses et les effets ostéolytiques.

Le thalidomide possède des propriétés antiangiogéniques, des effets immunomodulateurs (effet anti-TNF, diminution de l'expression des molécules d'adhésion) et une action antitumorale directe en induisant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Le PS341 est un nouveau médicament encore en phase d'essai. Il inhibe le protéasome et ainsi diminue la dégradation des protéines intracellulaires dont IkB. Cette forte quantité de IkB libre peut se lier à NFkB et va l'inhiber. Le PS341 régule également des protéines régulatrices du cycle cellulaire, comme P53 et P21.

2. LE LYMPHOME FOLLICULAIRE

2.1. Définition

Le lymphome folliculaire est une tumeur maligne lymphoïde B dont l'architecture reproduit celle des follicules secondaires des organes lymphoïdes périphériques dont ils dérivent. C'est une prolifération maligne monoclonale dérivant des cellules B des centres germinatifs des follicules lymphoïdes.

Les lymphomes folliculaires forment un groupe homogène de lymphomes non hodgkiniens (LNH) par leurs caractéristiques morphologiques, immunologiques et moléculaires.

Les follicules tumoraux sont constitués de cellules B matures, dont la morphologie et le phénotype immunologique sont très voisins de ceux des cellules centro-folliculaires normales. Au niveau de leur architecture, on note un développement exagéré des centres germinatifs aux dépens de la couronne lymphocytaire du manteau qui se trouve très réduite, voire absente.

Parfois dit « indolent », le lymphome folliculaire a une évolution lente mais inéluctable.

2.2.Epidémiologie

Le lymphome folliculaire représente 20% à 30% des lymphomes non hodgkiniens en Europe et aux Etats–Unis. L'incidence est en augmentation dans les pays développés. En France, on diagnostique environ 2000 nouveaux cas par an.

L'âge médian lors du diagnostic de ce lymphome est de 54 ans et une prépondérance masculine est constatée avec 1,27 hommes pour une femme.

On observe une incidence plus faible dans l'ethnie asiatique avec moins de 10% de lymphome folliculaire en Asie.

La survie médiane est de 9 ans. Au fur et à mesure de l'évolution du lymphome folliculaire, le taux de réponse au traitement diminue, la durée de réponse est de plus en plus brève et la quasi-totalité des malades décède de leur hémopathie B.

Les facteurs de risques sont le plus souvent inconnus.

2.3. Oncogenèse

Les événements au cours de l'oncogenèse du lymphome folliculaire restent encore inconnus mais différents réarrangements moléculaires sont repérés lors de la transformation histologique du lymphome folliculaire. La translocation t(14 ;18)(q32 ;q21) est détectée chez 75 à 85% des patients, ce qui entraîne une dérégulation des gènes *IGH* et *BCL2* et une hyperexpression de la protéine *BCL2*. Cet événement principal prolonge la vie cellulaire par blocage du processus d'apoptose donc joue un rôle dans l'agressivité du lymphome, la dissémination et la résistance aux thérapies.

Des anomalies cytogénétiques secondaires sont également observées comme le réarrangement de l'oncogène *C-MYC* qui est retrouvé dans 8% des cas étudiés par Yano et al. en 1992.

D'autres anomalies sont aussi impliquées comme la mutation de *P53*, la délétion du chromosome 9p21 (p16 et p15), les délétions de 6q, ainsi que les réarrangements des locis de *BCL-6* en 3q27 et *BCL-3* en 19q13 (Lerner et Burns, 2003).

La translocation t(8 ;9)(q24 ;p13) semble également intervenir dans la pathogenèse du lymphome folliculaire (Nacheva et al., 1993)

2.4. Diagnostic clinique, biologique et cytogénétique

Le diagnostic est souvent porté après plusieurs mois, voire plusieurs années d'évolution et il est révélé en général par un syndrome polygangionnaire. Le diagnostic de lymphome folliculaire se fait à partir d'une biopsie d'un ganglion lymphatique et par l'observation de nodules ou follicules constitués de cellules B néoplasiques sur l'ensemble du ganglion.

Une augmentation du taux de la b2-microglobuline sérique est au-delà de 3mg/l dans 35% des cas.

En cytogénétique, on constate la translocation t(14 ;18), mais également des anomalies structurales : gain d'une partie du 18 et du 8 ; gain des chromosomes entiers X, 7 et 2 ; perte d'une partie du 6 et du 17.

2.5. Traitements

2.5.1. Facteurs pronostiques

Il a été établi une liste de facteur de mauvais pronostic :

- ✓ Age supérieur à 60-70 ans
- ✓ Sexe masculin
- ✓ Lymphome folliculaire à grandes cellules
- ✓ Architecture folliculaire et diffuse
- ✓ Index prolifératif élevé
- ✓ Présence de certaines anomalies génétiques
- ✓ Plus d'une localisation extraganglionnaire
- ✓ Tumeur de diamètre supérieur à 7-10 cm
- ✓ Infiltration médullaire importante
- ✓ Anémie
- ✓ Augmentation des LDH sériques
- ✓ Augmentation de la b2-microglobuline sérique

2.5.2. Les traitements

Le traitement dépend de l'âge, du stade localisé ou disséminé, du stade établi selon la classification de Ann-Arbor et de l'importance de la masse tumorale.

➢ Pour les formes localisées (stade 1 et 2)

-

La radiothérapie exclusive sur l'aire ganglionnaire atteinte a été longtemps le traitement de référence. Le taux de rechute locale est inférieur à 10% et la survie sans rechute à 10 ans après radiothérapie exclusive des stades localisés est d'environ 50%. Les facteurs d'échec du traitement sont l'âge, des symptômes B, le stade de la maladie et l'importance du volume tumorale.

On utilise également *l'exérèse chirurgicale* ou *la chimiothérapie* qui est composée de l'association de cyclophosphamide, vincristine et prednisone, puis administrée en général en situation adjuvante après radiothérapie.

➢ Pour les formes disséminées (stade 3 et 4)

-

Il y a différents traitements : l'abstention de faible masse tumorale, la radiothérapie, la monochimiothérapie, la polychimiothérapie avec un cocktail de type CHOP, l'irradiation corporelle totale et l'interféron a.

Pour les lymphomes « indolents », il n'y a pas de chimiothérapie curative et la rémission complète est rarement obtenue.

L'introduction récente du Rituximab (anti-CD20 humanisé) modifie la prise en charge thérapeutique actuelle.

3. LE GENE DES IMMUNOGLOBULINES

3.1. Structure des immunoglobulines

Les lymphocytes B possèdent une immunoglobuline membranaire (appelée BCR) formée de quatre chaînes polypeptidiques, identiques deux à deux: deux chaînes légères (L)κ ou λ et deux chaînes lourdes (H) μ, δ, γ1, γ2, γ3, γ4, α1, α2, ε. Les chaînes L sont formées de deux domaines, un domaine variable distal (VL) et un domaine constant proximal (CL). Les chaînes H comportent un domaine N-terminal variable (VH) et 3 (δ, γ, α) ou 4 (μ, ε) domaines constants (CH). L'association des parties variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère constitue le site de liaison pour l'antigène. Le type de la chaîne lourde définit la classe et la sous-classe de l'immunoglobuline. Les parties variables du BCR sont le support de la diversité du répertoire B.

Chacun des domaines variables VL et VH possède 3 zones hypervariables ou « régions déterminant la complémentarité (CDR) ». La région située entre les domaines CH1 et CH2 des chaînes H ou région charnière assure la flexibilité de la molécule. Les zones situées entre les domaines sont des sites de clivage pour les enzymes protéolytiques.

L'action de la papaïne sur la molécule d'IgG libère deux fragments Fab (L + VH-CH1) monovalents et un fragment Fc (dimère des domaines CH2 + CH3) (Révillard 1998).

3.2. Le gène codant les immunoglobulines

L'ensemble des segments géniques participant à la synthèse des chaînes lourdes des immunoglobulines est, chez l'homme, sur le chromosome 14 (en 14q32). Le locus *IGH* s'étend sur 1350 kb.

La synthèse d'une chaîne lourde nécessite l'intervention de quatre types de gènes : un segment VH (variable), un segment DH de diversité, un segment JH de jonction et un segment CH qui code la partie constante.

Chez l'homme, il existe 87 segments VH appartenant à 7 familles VH. Le nombre de VH fonctionnels varie de 46 à 50 selon les haplotypes par suite d'un polymorphisme allélique avec insertion ou délétion d'une région de 80 kb. 30 à 40% des segments VH sont des pseudogènes par suite de mutations ponctuelles ou de délétions (Révillard, 1998). Chaque segment VH est précédé par une courte séquence dite séquence leader L, séparée du segment V par un court intron, excisé lors de la maturation de l'ARN messager.

Les segments D sont au nombre de 27, les segments J sont au nombre de 6 et les régions C sont au nombre de 9, codant chacun des isotypes. Ils sont regroupés sur environ 200 kb et s'organisent dans l'ordre suivant, du télomère au centromère : Cμ-d, Cγ3, Cγ1, Cα1, Cγ2, Cγ4, Ce et cα2 (Kaplan et al. 1993)

Chaque segment CH (sauf Cδ et les pseudogènes Ψ) est précédé d'une séquence S ou switch, constituée de séquences pentamères répétitives en tandem (1 à 3 kb) située 1 à 2 kb en amont. Il y a également des régions switch non conventionnelles appelées s qui se localisent en amont des régions d, ye et yg (Bergsagel et al., 1996).

Des séquences stimulatrices appelées enhancer (E) se situent dans l'intron entre les gènes J et Cm, en 5' a1 et a2. Ces séquences sont tissus spécifiques et permettent la régulation des gènes des Ig (Kaplan et al.,1993). Ces enhancers pourraient se comporter comme des LCR (Locus Control Region),

c’est-à-dire qu’ils pourraient stimuler la transcription de gènes très éloignés.

3.3. Différenciation indépendante de l’antigène

Dans l’espèce humaine, la moelle osseuse représente à la fois le siège de l’hématopoïèse et le site de différenciation initiale des lymphocytes B.

Le premier stade de différenciation correspond aux recombinaisons qui aboutissent à la constitution d’un gène de chaîne lourde μ fonctionnel puis à la synthèse de la chaîne correspondante.

Le précurseur le plus immature engagé dans la différentiation B est le lymphocyte pro B. A ce stade, les segments DH et JH sont réarrangés. Cette première recombinaison se produit entre l’un des segments DH pris au hasard et l’un des segments JH pris au hasard.

Le lymphocyte pro B passe au stade pré B après une deuxième recombinaison qui met bout à bout un segment VH pris au hasard et le complexe D-J résultant de la première recombinaison.

Ces deux recombinaisons nécessitent l’intervention de deux gènes : Recombination Activating Gene 1 et 2 (*RAG-1* et *RAG-2*) qui codent pour des recombinases. La recombinase produit du gène *RAG-1* a une activité d’endonucléase et de ligase. Elle reconnaît deux séquences constituées chacune d’un heptamère et d’un nonamère situées en 3’ des segments V, en 3’ et 5’ des segments D et en 5’ des segments J.

Les deux heptamères et les deux nonamères s’associent, permettant de mettre bout à bout les segments DH et JH puis les segments VH et le complexe D-J. L’ADN intermédiaire est éliminé par délétion sous forme de boucle d’excision. Le produit du gène *RAG2* amplifie d’un facteur 1000 l’activité de RAG 1.

Ces recombinaisons somatiques comportent un nombre élevé de réarrangements non fonctionnels. Elles sont tentées sur l’un des deux allèles pris au hasard.

Si le réarrangement VDJ est productif, une chaîne μ fonctionnelle est synthétisée et son expression à la surface de la cellule inhibe les réarrangements sur l’autre allèle et initie les recombinaisons des chaînes légères. Le second allèle n’est alors pas recombiné et ne pourra être exprimé. Ce phénomène, appelé exclusion allélique explique pourquoi chaque cellule pré B ne synthétise qu’un seul type de chaîne lourde μ.

Au contraire, si le réarrangement est abortif, une nouvelle recombinaison est tentée sur le deuxième allèle. Si le réarrangement VDJ n’est fonctionnel sur aucun des deux allèles, la cellule est éliminée par apoptose (Lassoued et al., 1995 ; Kaplan et Delpech, 1993 ; Révillard, 1998)

Dès qu'une chaîne lourde μ fonctionnelle est synthétisée, la recombinaison au niveau des gènes des chaînes légères est ensuite effectuée: κ puis λ en cas d'échec.

L'ensemble des segments codant les chaînes κ est situé sur le chromosome 2 et pour les chaînes λ sont situés sur le chromosome 22. Contrairement aux gènes codant les chaînes lourdes, il n'y a pas de segment D. La recombinaison s'effectue entre l'un des segments V pris au hasard et l'un des segments J pris au hasard. Le complexe V-J ainsi formé est ensuite associé à l'unique segment C qui ne contient pas d'intron. A la différence des gènes codant les chaînes κ, il existe au moins 6 segments C différents, chacun étant précédé d'un seul segment J qui lui est propre.

Les mécanismes de recombinaison et de synthèse impliqués pour les chaînes légères sont les mêmes que ceux des chaînes lourdes. Le premier réarrangement fonctionnel bloque les suivants.

Le lymphocyte B différencié n'exprime qu'un seul segment recombiné VH, DH, JH et une seule chaîne légère κ dans deux tiers des cas ou λ dans un tiers des cas.

Il quitte alors la moelle osseuse et migre dans la pulpe rouge de la rate ou dans les organes lymphoïdes secondaires. Le lymphocyte B circulant mature coexprime à sa surface IgM et IgD, par un mécanisme d'épissage alternatif.

3.4. Différenciation dépendante de l'antigène

Dans le centre germinatif des tissus lymphoïdes, le lymphocyte B poursuit sa différentiation sous l'action de cytokines, en étroite collaboration avec les cellules T et les cellules dendritiques folliculaires qui vont lui permettre de devenir spécifique d'un antigène. La maturation du lymphocyte B lors de la réponse immune B secondaire correspond à des modifications morphologiques, immunophénotypiques et moléculaires.

Deux évènements moléculaires, les mutations somatiques et la commutation isotypique, sont à l'origine des modifications au niveau des gènes des immunoglobulines.

Le phénomène de mutations somatiques correspond à des mutations aléatoires des régions variables, à un taux d'environ 1/1000 paires de bases.

Il en résulte une augmentation de l'affinité de l'immunoglobuline pour l'antigène (Bakkus et al., 1992 ; Vanasse et al., 1999 ; Avet-Loiseau et al., 2000). Ces mutations somatiques sont localisées dans une région d'environ 1,5 kb en aval du promoteur. Différents mécanismes ont été impliqués :

- substitutions de nucléotides, silencieuses ou non
- insertions ou délétions de nucléotides (Goossens et al., 1998 ; Wilson et al., 1998 ; Feuillard

et al., 2000)

Les mutations somatiques des régions variables des gènes des immunoglobulines apparaissent au stade centroblaste et ont lieu uniquement au sein du centre germinatif. La différenciation du centroblaste en centrocyte est caractérisée par un arrêt de prolifération et par la rencontre avec l'antigène présenté par la cellule dendritique folliculaire qui permet de sélectionner positivement les centrocytes : les cellules ayant une immunoglobuline de faible affinité pour l'antigène ou non fonctionnelle (du fait de mutations somatiques non fonctionnelles) meurent par apoptose, les autres poursuivent leur différenciation et subissent le phénomène de commutation isotypique.

Au cours de la commutation isotypique ou switch, les IgM synthétisées et sécrétées par le lymphocyte B (caractéristiques de la réponse immune B primaire) laissent place à des immunoglobulines d'une nouvelle classe : IgG, IgA ou plus rarement IgE. Le switch fait intervenir des processus délétionnels au niveau de régions homologues appelées zones switch ou séquences S. Ces régions, constituées d'environ 10 kb, sont situées 1 à 2 kb en 5' de chacune des régions constantes (sauf la région Cδ et les pseudogènes).

Il se produit une recombinaison somatique entre la séquence S du gène μ et l'une des séquences S des gènes codant la partie constante des autres isotypes (γ, α, ε).

L'ADN entre ces deux séquences est alors délété sous forme de boucle d'excision (figure 12). La partie constante de l'immunoglobuline se trouve ainsi associée au complexe VDJ déjà formé. Le switch ne modifie donc pas la spécificité de l'immunoglobuline pour l'antigène puisque seule la région constante est modifiée.

Cette recombinaison est donc un switch légitime qui s'effectue entre deux régions switch et constitue une région switch hybride.

Ces deux évènements moléculaires, mutations somatiques et commutation isotypique, sont probablement à l'origine des cassures et des translocations chromosomiques, notamment entre un chromosome porteur de gène d'immunoglobuline et un chromosome porteur d'un proto-oncogène. Un switch illégitime qui se caractérise par l'intervention d'une seule région switch peut également engendrer des translocations chromosomiques, des délétions, des insertions ou des inversions (Bergsagel et al., 1996).

Les centrocytes sauvés de l'apoptose se différencient soit en plasmoblastes soit en cellules B mémoire. Les plasmoblastes finissent leur différenciation dans la moelle osseuse ou dans la lamina propria de l'intestin. Les cellules B mémoire s'accumulent dans la zone marginale des follicules.

4. RAPPELS SUR LES TRANSLOCATIONS DANS LE MM

Les réarrangements du chromosome 14q32 sont retrouvés dans 60 à 75% des MM au diagnostic ou en rechute avec différents partenaires. Ces translocations ont pour conséquence la dérégulation d'un oncogène (Avet-Loiseau et al., 2002).

Les translocations t(11 ;14) et t(4 ;14) sont réciproques et démontrent la possibilité que le gène *IGH* puisse déréguler en même temps un ou deux oncogènes.

La translocation t(11 ;14)(q13 ;q32) est retrouvée chez 16% des patients atteints de MM et 25% à 31% de lignées de MM (Bergsagel, 2001 ; Avet-Loiseau et al., 2002, Bergsagel, 2003). L'oncogène *CCND1* qui code la cycline D1 intervenant dans le cycle cellulaire au niveau de G1S est hyperexprimé, le gène *MYEOV* peut également être dérégulé (Chesi, 2000). Le gène *CCND1* se trouve juxtaposé à l'enhancer Ea des IGH sur le der(14) ; alors que le gène *MYEOV* reste sur le der(11) associé à l'enhancer Em en 5' ou à l'enhancer Ea en 3' (figure 13 ; Janssen, 2000). Sur le chromosome 14q32 les points de cassure se produisent soit dans la région JH à cause d'erreurs lors des mutations somatiques, soit dans une région « switch » du fait de problème lors de la commutation isotypique. Sur le chromosome 11, les points de cassure sont dispersés sur environ 300 kb centromérique par rapport à *CCND1* sans préférence pour le MTC (Major Translocation Cluster) (Bergsagel, 2001 ; Janseen et al., 2000).

La translocation t(4 ;14)(p16 ;q32) est retrouvée chez environ 15-20 % des patients et 23% des lignées de MM (Moreau, 2000 ; Avet-Loiseau, données personnelles). Le gène *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) est un oncogène de la famille des récepteurs de type tyrosine kinase et intervient dans la prolifération, la différenciation et la migration des fibroblastes ; il n'est pas exprimé dans les plasmocytes normaux.

Le gène *MMSET* (Multiple Myeloma SET domain) code un facteur de transcription exprimé dans les tissus embryonnaires à croissance rapide (Pratt, 2002) et intervient dans le remodelage de la chromatine.

Les points de cassures sur 4p16 sont télomériques par rapport au gène *MMSET*, dans les introns ou les premiers exons en 5' de ce gène. Sur le der(4), les régions VDJ jusqu'à l'enhancer Em du gène des *IGH* sont juxtaposées aux exons centromériques du proto-oncogène *MMSET*. D'autre part, le der(14) est obtenu par juxtaposition de *FGFR3* et d'un enhancer fort situé en 3' du gène CHa2 de *IGH*, induisant une hyperexpression de *FGFR3*.

La translocation t(14 ;16)(q23 ;q11) est retrouvée chez 5% chez des patients avec un MM et dans

20 à 25% des lignées cellulaires de MM (Chesi et al., 1998 ; Avet-Loiseau, données personnelles). L'oncogène *C-MAF* est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation et la prolifération cellulaire. Dans la translocation t(14 ;16), on retrouve des particularités observées dans la t(4 ;14).

Les réarrangements avec d'autres partenaires inconnus sont observés dans 44% des MM (Avet-Loiseau et al., 2002).

5. LES GENES *C-MYC* ET *PAX5*

5.1. Généralités sur gène *C-MYC*

Chez l'homme, le proto-oncogène *C-MYC* se localise sur le bras long du chromosome 8 à la bande q24 et s'étend sur 5 000 paires de bases. Le gène possède 3 exons : le premier exon d'environ 550 paires de bases est la région non-traduite de l'ARNm, alors que les deux autres codent une phosphoprotéine nucléaire de 439 acides aminés (Kaplan et Szajnert, 1985). Le gène *C-MYC* code un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines « basic-helix-loop-helix/leucine zipper » ou bHLH/LZ dont le domaine basique reconnaît une séquence spécifique d'ADN CACGTG, le domaine HLH/LZ permettant une homo- ou une hétérodimérisation.

Le gène *C-MYC* est défini comme un *immediate early gene*, autrement dit un gène rapidement régulé lorsque les cellules passent d'une phase quiescente (G0) à une phase de croissance. Cependant, l'expression de c-myc persiste au cours des phases G1, S, G2 et M. La surexpression de c-myc favorise la transition G1/S et la progression dans le cycle cellulaire, mais va également inhiber certains processus de différenciation cellulaire donc provoque la mort par apoptose.

5.2. Généralités sur le gène *PAX5*

Le gène *PAX5* se situe dans la région q13 du chromosome 9 et couvre 200 713 paires de bases, il est constitué en 10 exons : Pax5-1 à Pax5-10. Il code un facteur de transcription BSAP (B-cell specific activator protein), cette protéine est formée de 391 acides aminés. Ce facteur de transcription joue un rôle dans l'hématopoïèse humaine et principalement exprimé dans les premières étapes du développement des cellules B.

Cette protéine régule la prolifération et la différenciation des cellules B ainsi que le maintien de

l'identité des cellules B. *PAX5* joue également un rôle dans le développement neural et la spermatogénèse.

5.3. Remaniements moléculaires de *C-MYC* et *PAX5*

5.3.1. Le myélome multiple

La dérégulation du gène *C-MYC* peut être due à des translocations mettant les séquences codantes du gène *C-MYC* sous la dépendance de régions régulatrices activatrices des gènes des immunoglobulines. Ces cas se traduisent par des translocations t(8 ;14), t(8 ;22) et t(2 ;8) observées dans certaines lignées de MM et présente chez 15% des patients (Avet-Loiseau et al.,2001). On a pu observer différentes translocations t(8 ;14) dans le MM.

La plus couramment observée place *C-MYC* ainsi que la partie distale du chromosome 8 en 5' des gènes de la région constante des chaînes lourdes des immunoglobulines. Les deux sites sont joints de sorte que les directions de transcription soient opposées, en subissant ou non une translocation du premier exon.

Les gènes d'anticorps présentent des exclusions alléliques, ce qui signifie que seuls les gènes de chaîne lourde de l'un des deux chromosomes sont utilisés. Le gène *C-MYC* est transloqué au niveau du locus non fonctionnel, ce qui explique que les cellules seraient capables de synthétiser des anticorps.

La plupart des points de cassure sur le chromosome 14 se produisent au sein des régions de commutation se trouvant devant les séquences qui codent pour les régions constantes des chaînes lourdes m, a ou g, alors que les points de cassure près de *C-MYC* sont très éparpillés.

Dans le MM, les oncogènes comme *C-MYC* sont souvent transloqués aux loci des gènes des anticorps. Les gènes des anticorps sont transcriptionnellement actifs dans les cellules B, ce qui pourrait constituer un aspect essentiel de leur rôle d'activateur de *C-MYC*. Les translocations dans les tumeurs de cellules B résultent d'erreurs de recombinaison au cours des réarrangements des gènes des immunoglobulines. Les points de cassure se trouvent au niveau des signaux de recombinaison, soit des séquences heptamère-nonamère qui participent au réarrangement des régions J, soit aux séquences de type « switch ». Ces mêmes signaux se retrouvent au voisinage du gène *C-MYC*, soit en amont soit en aval, et sont source d'erreur pour la recombinase. Toutefois, d'autres types de translocations pourraient impliquer le processus de mutation somatique.

Au lieu de joindre deux segments d'un gène d'anticorps, ils joignent un proto-oncogène à un

gène *IGH*. Cette explication pourrait rendre compte de translocations intervenant pendant la commutation du locus de chaîne lourde.

Le gène *C-MYC* s'exprime de façon anormale, soit franchement élevée, soit à un taux modéré mais permanent, à la différence des cellules normales où il ne s'exprime que dans une fenêtre étroite du cycle cellulaire (entre G0 et G1). On constate différents mécanismes qui semblent déclencher l'événement activateur de *C-MYC*. Le premier exon peut être exclu et donc provoquer une activation incontrôlée, cet exon paraissant jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'expression de *C-MYC* par son propre produit (auto-inhibition).

Sinon, une cis-activation peut se produire par le rapprochement d'un « enhancer » de la région du « switch » des gènes des chaînes lourdes des Ig.

Un autre mécanisme peut être l'apparition de mutations ponctuelles siégeant dans et autour du premier exon. Ces événements peuvent « désensibiliser » le premier exon vis-à-vis de facteurs trans-régulateurs ou cis-régulateurs, ou encore de stabiliser la durée de vie normalement brève du messager.

5.3.2. Le lymphome folliculaire

La translocation t(14 ;18) est détectée dans au moins 85 % des lymphomes folliculaires. Le gène *C-MYC* joue également un rôle dans le lymphome folliculaire, surtout à la phase de transformation car il peut être dérégulé par sa juxtaposition avec le locus des *IGH* ou des *IGL* sur le chromosome 14. D'où l'action synergique de la dérégulation des gènes *BCL-2* et *C-MYC* (Nacheva et al., 1993). Il a été également observé que la région 9q13 qui contient le gène *PAX5* est délétée dans certains lymphomes (Lerner, 2003).

La translocation t(8 ;9)(q24.1 ;p13 .3) a été mise en évidence dans deux lignées de lymphome folliculaire, par Nacheva et son équipe en 1993, mais les points de cassure et les mécanismes sont encore obscurs.

L'objectif principal de ce travail est de caractériser les réarrangements moléculaires de *C-MYC* dans ces deux modèles de lymphopathies B.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson K.C., Shaughnessy J.D., Barlogie B., Harousseau J.L., Roodman G.D. Multiple myeloma. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2002: 214-40.

Avet-Loiseau H., Li JY., Facon T., Brigaudeau C., Morineau N., Maloisel F., Rapp MJ.,Talmant P., Trimorreau F., Accard A., Harousseau JL., Bataille R. High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. Cancer Res 1998;

58 (24): 5640-5.

Avet-Loiseau H., Brigaudeau C., Morineau N., Talmant P., Laï J.L., Daviet A., Li JY., Praloran V., Rapp MJ., Harousseau JL., Facon T., Bataille R. High incidence of cryptic translocations involving the Ig heavy chain gene in multiple myeloma, as shown by fluorescence in situ hybridization. Genes Chromosomes Cancer 1999a; 24 (1): 9-15.

Avet-Loiseau H., Facon T., Daviet A. Godon C.,Rapp MJ., Harousseau JL., Grosbois B., Bataille R. Intergroupe Francophone du Myelome. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Cancer Res 1999b; 59 (18): 4546-50.

Avet-Loiseau H., Minvielle S., Mellerin MP., Mangrangeas F., Bataille R. 14q32 chromosomal translocations: a hallmark of plasma cell dyscrasias? Hematol J 2000; 1 (5): 292-4.

Avet-Loiseau H., Gerson F., Magrangeas F., Minvielle S., Harousseau JL., Bataille R. Intergroupe Francophone du Myelome. Réarrangements of c-myc oncogène are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. Blood 2001; 98 (10): 3082-3086.

Avet-Loiseau H., Facon T., Grosbois B., Magrangeas F., Rapp MJ., Harousseau JL., Minvielle S., Bataille R. Intergroupe Francophone du Myelome. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. Blood 2002; 99 (6): 2185-91.

Bakkus MH., Heirman C., Van Riet I., Van Camp B., Thielemans K. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. Blood 1992; 80 (9): 2326-35.

Bataille R., Harousseau JL. Multiple myeloma. N Engl J Med 1997; 336 (23): 1657-64.

Bergsagel PL., Chesi M., Nardini E., Brents LA., Kirby SL., Kuelh WM. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93 (24): 13931-6.

Bergsagel DE., Wong O., Bergsagel PL., Alexanian R., Anderson K., Kyle RA., Raabe GK. Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. Blood 1999; 94 (4): 1174-82.

Bergsagel PL., Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. Oncogene 2001; 20 (40): 5611-22.

Bergsagel PL. Chemotherapy of multiple myeloma: Melphalan-40 years old and still going strong. Biol Blood Marrow Transplant 2003; 9 (1):2-3.

Bergsagel PL. Prognostic factors in multiple myeloma: It's in the genes. Clin Cancer Res 2003; 9 (2): 533-534.

Bezieau S., Devilder MC., Avet-Loiseau H., Mellerin MP., Puthier D., Pennarun E., Rapp MJ., Harousseau JL., Moisan JP., Bataille R. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. Hum Mutat 2001; 18 (3): 212-24.

Borson ND., Lacy MQ. et Wettstein PJ. Altered mRNA expression of Pax5 and Blimp-1 in B cells in multiple myeloma. Blood 2002, 100 (13): 4629-4639

Brunner RM., Goldammer T., Furbass R., Vanselow J., Schwerin M. Genomic organization of the bovine aromatase encoding gene and a homologous pseudogene as revealed by DNA fiber FISH. Cytogenet Cell Genet 1998; 82 (1-2): 37-40.

Brunning RD., McKenna RW. Atlas of tumor athology: Tumors of the bone marrow. Armed Forces Institute of Pathology 1994; third serie, fascicule 9: 323-351.

Chesi M., Nardini E., Brents LA.,Schrock E., Ried T., Kuehl WM., Bergsagel PL. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. Nat Genet 1997; 16 (3): 260-4.

Chesi M., Bergsagel PL., Shonukan OO., Martelli ML., Brents LA., Chen T., Schrock. E.,Ried T., Kuehl WM. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. Blood 1998; 91 (12): 4457-63.

Chesi M., Kuehl WM., Bergsagel PL. Recurrent immunoglobulin gene translocations identify distinct molecular subtypes of myeloma . Ann Oncol 2000; 11 Suppl 1: 131-135.

Dalton WS., Bergsagel PL., Kuehl WM., Anderson KC., Harousseau JL. Multiple myeloma. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2001: 157-77.

Drexler HG., Matsuo Y. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and pasma cell leukemia. Leukemia Research 2000; 24: 681-703.

Erdel M., Hubalek M., Lingenhel A., Kofler K., Duba HC., Utermann G. Counting the repetitive kringle-IV repeats in the gene encoding human apolipoprotein(a) by fiber-FISH. Nat Genet 1999; 21 (4): 357-8.

Fabris S., Storlazzi CT., Baldini L., Nobili L., Lombardi L, Maiolo AT., Rocchi M., Neri A. Heterogeneous pattern of chromosomal breakpoints involving the MYC locus in multiple myeloma. Genes Chromosomes Cancer 2003; 37(3): 261-9.

Facon T. Traitement conventionnel du myélome multiple. Hématologie 1997; 3: 245-55.

Fassas AB., Spencer T., Sawyer J., Zangari M., Lee CK., Anaissie E., Muwalla F., Morris C., Barlogi CB., Tricot G. Both hypodiploidy and deletion of chromosome 13 independently confer poor prognosis in multiple myeloma. Br J Haematol 2002; 118 (4): 1041-7.

Feuillard J. et Raphaël M. Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. Hématologie 2000; 6: 345-59.

Flanagran JG. et Rabbitts TH. Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region implies evolutionary duplication of a segment containing g, e et a genes. Nature 1982; 300 (23/30): 709-713.

Fonseca R., Blood EA. Oken MM., Kyle RA., Dewald GW., Bailey RJ., Van Wier SA., Henderson KJ., Hoyer JD., Harrington D, Kay NE., Van Ness B., Greipp PR. Myeloma and the t(11;14)(q13;32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. Blood 2002; 99(10): 3735-41.

Gabrea A., Bergsagel PL., Chesi M., Shou Y., Kuehl WM. Insertion of excised IgH switc sequences causes overexpression of cyclin D1 in a myeloma tumor cell. Mol Cell 1999; 3(1): 119-123.

Goossens T., Klein U., Kuppers R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (5): 2463-8.

Grosbois B., Decaux O., Azais I., Facon T., Avet-Loiseau H. Current treatment strategies for multiple myeloma. Eur J Internal Med 2002; 13 (2): 85-95.

Hallek M., Bergsagel PL., Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. Blood 1998; 91 (1): 3-21.

Hanamura I., Iida S., Akano Y., Hayani Y., Kato M., Miuri K., Harada S., Banno S., Wakita A., Kiyoi H., Naoe T., Shimizu S., Sonta SI., Nitla M., Taniwaki M., Ueda R. Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations. Jpn J Cancer Res 2001; 92 (6): 638-44.

Heiskanen M., Karhu R., Hellsten E., Peltonen L., Kallioniemi OP., Palotie A. High resolution mapping using fluorescence in situ hybridization to extended DNA fibers prepared from agarose-embedded cells. Biotechniques 1994; 17 (5): 928-929.

Heiskanen M., Hellsten E., Kallioniemi OP., Mäkelä TP., Alitalo K., Peltonen L., Palotie A. Visual mapping by fiber-FISH. Genomics 1995; 30 (1): 31-6.

Heiskanen M., Kallioniemi O., Palotie A. Fiber-FISH: experiences and a refined protocol. Genet Anal 1996a; 12 (5-6): 179-84.

Heiskanen M., Peltonen L., Palotif A. Visual mapping by high resolution FISH. Trends Genet 1996b; 12 (10): 379-82.

Herrick J., Bensimon A. Imaging of single DNA molecule: applications to high-resolution genomic studies. Chromosome Res 1999; 7 (6): 409-23.

Herrick J., Michalet X., Conti C., Schurra C., Bensimon A. Quantifying single gene copy number by measuring fluorescent probe lengths on combed genomic DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (1): 222-7.

Ho JP., Brown RD., Pelka GJ., Basten A., Gibson J., Joshua DE. Illegitime switch recombiaisons are present in approximately half of primary myeloma tumpors, but do not relate to know prognostic indicators or survival. Blood 2001; 97 (2): 490-495.

Janssen JW., Vaandrager JW., Heuser T., Jauch A., Kluin PM., Geelen E., Bergsagel PL., Kuelh WM., Drexler HG., Otsuki T., Bartram CR. et Schuuring E. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). Blood 2000; 95 (8): 2691-2698.

Kaplan JC, Delpech M. Biologie moléculaire et médecine : de la biologie à la clinique, 2ème Ed. Médecine-Sciences Flammarion edition; 1993; p. 150-62.

Kaplan JC. et Szajnert MF. Chromosomes et cancer, le paradigme du lymphome de Burkitt. Médecine-Sciences 1985; p. 17-23.

Keats JJ., Reiman T., Maxwell CA., Taylor BJ., Laratt LM., Mant MJ., Belch AR. et Pilarski LM. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. Blood 2003; 101 (4): 1520-9..

Kuipers J., Vaandrager JW., Weghuis DO., Pearson PL., Scheres J., Lokhorst HM. Clevers H., Bast BJ. Fluorescence in situ hybridization analysis shows the frequent occurrence of 14q32.3 rearrangements with involvement of immunoglobulin switch regions in myeloma cell lines. Cancer Genet Cytogenet 1999; 109 (2): 99-107.

Lassoued K, Benlagha K. Gènes impliqués dans la différentiation et le développement du lymphocyte B. Hématologie 1995; 6:477-88.

Lerner RE. et Burns LJ. Tranformed lymphoma: an Achilles'heel of non-hodgkin's lymphoma. Bone Marrow Transplanta 2003; 31: 531-537.

Liu YJ., Arpin C., De Bouteiller O., Guret C., Blanchereau J., Martinez-Valdez H., Lebecque S. Sequential triggering of apoptosis, somatic mutation and isotype switch during germinal center development. Semin Immunol 1996; 8 (3): 169-77.

Michalet X., Ekong R., Fougerousse F., Rousseaux S., Schurra C., Hornigold N., Van Slegtenhorst M., Wolfe J., Povey S., Beckmann JS. et Bensimon A. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. Science 1997; 277 (5331): 1518-23.

Moreau P., Facon T., Leleu X., Morineau N., Harousseau JL., Bataille R., Avet-Loiseau H.

Intergroupe Francophone du myélome. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. Blood 2002; 100 (5): 1579-83.

Nacheva E., Dyer MJS., Fischer P., Stranks G., Heward JM., Marcus RE., Grace C., Karpas A. C-myc translocations in de novo B-cell lineage acute leukemias with t(14;18) (cell lines Karpas 231 and 353). Blood 1993; 82 (1): 231-240.

Pratt G. Molecular aspects of multiple myeloma. Mol Pathol 2002; 55 (5): 273-83.

Révillard JP. Immunologie, 3ème Ed. De Boeck Université ed; 1998.

Rosenberg C., Florijn RJ., Van de Rijke FM., Blonden LA., Raap TK., Van ommen GJ., Den Dunnen JT. High resolution DNA fiber-fish on yeast artificial chromosomes: direct visualization of DNA replication. Nat Genet 1995; 10 (4): 477-9.

Senger G., Jones TA., Fidlerova H., Sanseau P., Trowsdale J., Duff M., Sheer D. Released chromatin: linearized DNA for high resolution fluorescence in situ hybridization. Hum Mol Genet 1994; 3 (8): 1275-80.

Shou Y., Martelli ML., Gabrea A., Qi Y., Brents LA., Roschke A., Dewald G., Kirsch RI, Bergsagel PL., Kuehl WM. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with ϵmyc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97 (1): 228-33.

Siebert R., Matthiesen P., Harder S., Zhang Y., Borowski A., Zühle-Jenisch R., Metzke S., Joos S., Weber-Matthiesen K., Grote W. et Schlegelberger B. Application of interphase fluorescence in situ hybridation for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. Blood 1998; 91 (3): 984-990.

Solal-Céligny P., Brousse N., Ferme C., Gisselbrecht C., Reyes F., Coiffier B. Lymphomes : lymphomes non-hogkiniens - maladie de Hodgkin, 3ème Ed. Edition: Frison-Roche,; 1997; p. 171-189.

Vaandrager JW., Kleiverda JK., Schuuring E., Kluin-Nelemans JC., Raap AK., Kluin PM. Cytogenetics on released DNA fibers. Verh Dtsch Ges Pathol 1997; 81: 306-11.

Vaandrager JW., Schuuring E., Kluin-Nelemans HC., Dyer MJ., Raap AK., Kluin PM. DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia : aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. Blood 1998; 92 (8): 2871-2878.

Vanasse GJ., Concannon P., Willerford DM. Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. Blood 1999; 94 (12):3997-4010.

Wilson PC., De Bouteiller O., Liu YJ., Potter K., Banchereau J., Capra JD., Pascual V. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. J Exp Med 1998; 187 (1): 59-70.